



TITLE:

Ser7 of RNAPII-CTD facilitates heterochromatin formation by linking ncRNA to RNAi(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kajitani, Takuiya

CITATION:

Kajitani, Takuiya. Ser7 of RNAPII-CTD facilitates heterochromatin formation by linking ncRNA to RNAi. 京都大学, 2018, 博士(医科学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13169>

RIGHT:

許諾条件により本文は2019-01-01に公開; final publication is available at <http://www.pnas.org/>

京都大学	博士（ 医科 学）	氏 名	梶 谷 卓 也
論文題目	Ser7 of RNAPII-CTD facilitates heterochromatin formation by linking ncRNA to RNAi RNAPII-CTD Ser7はncRNA と RNAi を繋ぐことによりヘテロクロマチン形成を促進する		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>＜ 背 景 ＞</p> <p>真核生物のゲノム中には多数の ncRNA がコードされており、RNA polymerase II(RNAPII)により転写される。一部の ncRNA は、核外輸送されずクロマチン上の特定の領域に留まり、エピジェネティックな修飾酵素の足場となる。ncRNA による遺伝子発現制御は発生や疾病に関与することから、分子基盤の解明は非常に重要である。</p> <p>分裂酵母のセントロメアヘテロクロマチン ncRNA(hRNA)は遺伝子発現制御のモデル系として活発に研究されている。過去の研究から、RNAPII が hRNA を転写すること、hRNA がクロマチン上に留まること、hRNA が RNAi の標的となること、RNAi 因子がヒストン H3Lys9 メチル化（H3K9me）酵素と結合することが知られている。一方で、hRNA が選択的に RNAi の標的となる分子基盤は不明であった。</p> <p>RNAPII の C 末端ドメイン(CTD)には、Y1-S2-P3-T4-S5-P6-S7 の 7 アミノ酸が、分裂酵母では 29 回、ヒトでは 52 回反復する特徴的な構造が存在する。CTD は高度にリン酸化され、転写と共役した RNA processing 因子や転写活性化ヒストン修飾酵素の足場となる。そこで CTD が hRNA の特殊性付与に関与すると予想した。</p> <p>＜ 結 果 ＞</p> <p>予想の検証のため、分裂酵母の CTD すべての Ser2, Ser5, Ser7 をアラニン置換した株(S2A, S5A, S7A)を作成した。その結果、S2A、S7A は hRNA の発現が過剰に亢進した。H3K9me の ChIP によってヘテロクロマチンの状態を調べたところ、S2A では野生型と同等である一方、S7A では顕著な減少が観察された。次いで、hRNA 由来の siRNA を Northern blot で調べたところ、S2A では野生型と同等、S7A ではほぼ完全に消失した。以上から Ser7 が RNAi を介したヘテロクロマチン形成に重要であると判明した。</p>			

<p>Ser7 による hRNA と RNAi の共役機構を調べるために、クロマチンに留まる hRNA への影響を調べた。その結果、S7A では hRNA の係留が顕著に減少した。次いで、hRNA をヘテロクロマチン上に係留する因子として Chp1 に着目した。Chp1 は Argonaute と結合すること、H3K9me に結合するクロモドメイン(CD)を有すること、CD の塩基性モチーフが RNA 結合能を持つことから、RNAi、ヘテロクロマチン、転写の同時制御を可能にする因子であると予想した。その予想について調べた結果、Chp1-CD 変異で hRNA 係留が大きく減少した。また、免疫沈降から RNAPII と Chp1 は Ser7 存在下において相互作用した。以上から、Ser7 は Chp1-CD と hRNA の結合を促進することで hRNA の係留を可能にすると判明した。</p> <p>ヘテロクロマチンは RNAi を介した self-enforcing loop により形成、維持されるため、各因子の関与する反応を詳細に解析することは困難である。そこで、人工的ヘテロクロマチン形成系を開発し、Ser7 の機能を特定することを試みた。その結果、Ser7 は primary siRNA を利用した Argonaute と標的 RNA の結合に重要であることを見出し、Ser7 がヘテロクロマチン領域での二次的 siRNA 増幅を可能にすると結論付けた。</p> <p>＜ 結 論 ＞</p> <p>以上から、RNAPII-CTD Ser7 が ncRNA と RNAi を繋ぐことでヘテロクロマチン形成を促進すると結論付けられた。本研究は、転写と ncRNA によるクロマチン制御の新たな協調機構を明らかにした。</p>

(論文審査の結果の要旨)

真核生物のゲノムには多数の ncRNA が存在する。一部の ncRNA は、転写後クロマチン上の特定の領域に留まり、エピジェネティックな修飾酵素の選択的局在の足場となる。ncRNA による標的遺伝子特異的な発現制御は発生や疾病に関与することから、分子基盤の解明は非常に重要である。分裂酵母のヘテロクロマチン ncRNA(hRNA)は siRNA に分解された後ヘテロクロマチン形成を促進する。hRNA からの siRNA 合成は転写と共役して起きるが、その詳細なメカニズムは不明であった。一方、RNA polymerase II の C 末端ドメイン (CTD) は、Y1-S2-P3-T4-S5-P6-S7 の 7 アミノ酸が、分裂酵母では 29 回、ヒトでは 52 回反復する特徴的な構造である。CTD は転写と共役した RNA プロセッシングや転写活性化ヒストン修飾を促進する。そこで CTD が siRNA 合成に関与すると予想した。

本研究で以下の 4 点を明らかにした。(1) CTD-Ser7 は siRNA 合成に必要であること、(2) Ser7 はクロモドメインタンパク質 Chp1 と協調して hRNA のクロマチン上への係留を促進すること、(3) Ser7 は siRNA の二次的増幅を促進すること、(4) Ser7 リン酸化 CTD と Chp1 は相互作用すること。以上から、CTD-Ser7 が ncRNA と RNAi を繋ぐことでヘテロクロマチン形成を促進すると結論付けた。

以上の研究は、転写と ncRNA によるクロマチン制御における新たな分子機構を明らかにしたもので、エピゲノム制御研究の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医科学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 1 月 24 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。